

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-501631

(P2003-501631A)

(43)公表日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int.Cl.
G 0 1 N 33/544
21/27
21/64

識別記号

F I
G 0 1 N 33/544
21/27
21/64

テ-マコ-ト^{*} (参考)
A 2 G 0 4 3
C 2 G 0 5 9
A
F
G

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-500867(P2001-500867)
(86) (22)出願日 平成12年5月18日(2000.5.18)
(85)翻訳文提出日 平成13年11月27日(2001.11.27)
(86)国際出願番号 PCT/EP00/04491
(87)国際公開番号 WO00/073798
(87)国際公開日 平成12年12月7日(2000.12.7)
(31)優先権主張番号 990/99
(32)優先日 平成11年5月27日(1999.5.27)
(33)優先権主張国 スイス(CH)

(71)出願人 ツエプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト
Z e p t o s e n s A G
スイス国 4108 ヴィッテルスヴィル ベンケンシュトラーゼ 254
(72)発明者 クレーガー, ディートマー
ドイツ国、デー-81369 ミュンヒエン、
バッサウアー・シュトラーゼ 39
(72)発明者 ヴォーゲル, オルスト
スイス国、ツェーハー-1028 プレヴェランジュ、シュマン・デュ・クロズレ 2
(74)代理人 弁理士 津国 勝 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 官能基化された小胞

(57)【要約】

本発明は、リガンドの識別及び結合のための生物学的、生化学的又は合成の識別要素を含むことを特徴とする、官能基化されポリマー補強(立体的に安定化)された小胞に関する。更に本発明の小胞は、場合により、生物分析的検出法においてシグナル生成成分として役立つ標識を含む。本発明はまた、該小胞の製造方法及び検出法におけるその用途に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 A) 小胞、

B) 小胞の内及び／又は外表面に結合している、1つ以上のポリマー分子、並びに

C) リガンドの認識及び結合のための、少なくとも1つの生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素（ここで、該認識要素は、小胞又はポリマー分子に結合又は吸着されている）

を含むことを特徴とする生物学的又は生化学的試薬。

【請求項2】 生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素が、抗体、抗体断片、核酸又は核酸類似体、DNA、RNA、酵素、天然及び合成ポリペプチド、ヒスチジンータグー成分並びに特に膜受容体を含む群から選択される、請求項1記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項3】 少なくとも1つの生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素が、小胞の表面に会合しているか、若しくは組み込まれているか、又はポリマー若しくは小胞の脂質に結合している、請求項1～2のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項4】 安定化ポリマーとして、水溶性ポリマーが使用される、請求項1～3のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項5】 安定化ポリマーとして、ポリエチレン glycole（これは、好ましくは分子量750～2000ダルトンを有する）、ポリペプチド、ポリスルホキシド、デキストランのような炭水化物及び樹状親水性ポリマーを含む群の親水性ポリマーが使用される、請求項1～4のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項6】 小胞が、ユニラメラである、請求項1～5のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項7】 小胞が、グリセロリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、スフィンゴミelin）、糖脂質、ステロール（例えば、コレステロール）、カルジョリピン、プ

ラスマロゲン、始原細菌に存在する脂質（例えば、エーテル基に結合した炭化水素鎖を持つもの、分岐炭化水素鎖を持つもの又は脂環構造と共に炭化水素鎖を持つもの）又は二極性脂質のような天然脂質、合成脂質（例えば、臭化ドデシルアノニウム（DODAB）のような正に荷電した脂質、又はボロ両親媒性物質）、及びフッ素化若しくはハロゲン化脂質炭化水素鎖又は活性化性若しくは重合性基を含む合成脂質を含む群の脂質を含むことを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項8】 更に、生物分析的検出法におけるシグナル生成成分として、標識が小胞に会合している、請求項1～7のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項9】 シグナル生成成分としての追加の少なくとも1つの標識が、小胞の内部に位置しているか、あるいは直接に、又はスペーサーによるか若しくはポリマーにより、小胞の表面に結合している、請求項8記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項10】 シグナル生成成分としての追加の標識が、ESR若しくはNMRスピン標識、質量標識、電気化学的標識又は特にルミネセンス標識若しくは蛍光標識を含む群から選択される、請求項8記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項11】 シグナル生成成分として、多数の類似したルミネセンス又は蛍光標識が、小胞に会合しているか、あるいは異なる発光波長かつ類似若しくは異なる励起波長の複数のルミネセンス又は蛍光標識が、小胞に会合している、請求項8記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項12】 ルミネセンス又は蛍光標識として、ルミネセンス又は蛍光ナノ粒子が使用される、請求項10又は11記載の生物学的又は生化学的試薬。

【請求項13】 請求項1～12のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬の製造方法であって、

- A) 透析による小胞製造に必要な脂質分子、
- B) 小胞の内及び／又は外表面に結合させるべき、1つ以上のポリマー分子、並びに

C) リガンドの認識及び結合のための、少なくとも1つの生物学的又は生化学的認識要素（ここで、この認識要素は小胞又はポリマー分子に結合又は吸着させるべきものである）

を逐次の混合及び蒸発工程において一緒にする方法。

【請求項14】 請求項1～12のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬を使用する、生物分析的検出法。

【請求項15】 アナライトが、電気化学的検出、インピーダンス分光分析、電子スピン共鳴、核スピン共鳴、水晶バランス測定、及び特に光学シグナル変化の検出、又はこれらの方法の組合せを含む群から選択される方法により検出される、請求項1～12のいずれか1項記載の生物学的又は生化学的試薬を使用する、請求項14記載の生物分析的検出法。

【請求項16】 光学シグナル変化の検出が、センサープラットホームとして作用する光学センサーにより実施される（ここで、好ましくは光学センサーは、光導波管センサー及び表面プラズモン共鳴センサーを含む群から選択される）、請求項15記載の生物分析的検出法。

【請求項17】 検出すべき光学シグナル変化が、センサー表面の近距離場における有効屈折率の変化、又は特にセンサーの近距離場において生成するルミネセンス若しくは蛍光の変化に基づく、請求項15～16のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項18】 センサープラットホームとして、平面又は纖維型導波管が使用される、請求項16～17のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項19】 センサープラットホームとして、第1の光学的に透明な層(a)を第2の光学的に透明な層(b)上に含む平面薄膜導波管が使用される、請求項18記載の生物分析的検出法。

【請求項20】 励起光が、センサープラットホームとして作用する平面薄膜導波管に、1個又は数個の格子(c)によりカップリングしている、請求項18記載の生物分析的検出法。

【請求項21】 層(a)よりも屈折率が低く、そして5nm～1000μm、好ましくは10nm～1000nmの厚さの、別の光学的に透明な層(b')が、

層（a）及び（b）の間で層（a）に接触して位置している、請求項16～20のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項22】 生物学的又は生化学的認識要素の固定化のために、接着促進層（f）が、光学的に透明な層（a）上に堆積している、請求項16～21のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項23】 センサープラットホームとして作用する薄膜導波管が、1つ以上の試料における1つ以上のアナライトの同時又は逐次測定のための、数個の測定領域を含むことを特徴とする、請求項19～22のいずれか1項記載のセンサーパラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項24】 横方向に分離した測定領域（d）が、生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素の該センサーパラットホーム上への横方向に選択的な堆積により生成される、請求項23記載のセンサーパラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項25】 格子構造（c）が、層（a）におけるインカップルした励起光の伝搬の方向に対して直交又は平行な方向で横方向に種々の周期性を有する、請求項20～24のいずれか1項記載のセンサーパラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項26】 第2の光学的に透明な層（b）の材料が、ガラス、水晶、又はポリカーボネート、ポリイミド若しくはポリメタクリル酸メチルを含む群の透明熱可塑性プラスチックを含むことを特徴とする、請求項19～25のいずれか1項記載のセンサーパラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項27】 第1の光学的に透明な層の屈折率が、2よりも大きい、請求項19～26のいずれか1項記載のセンサーパラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項28】 第1の光学的に透明な層（a）の厚さが、40nm～300nmである、請求項19～27のいずれか1項記載のセンサーパラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項29】 格子（c）が、200nm～1000nmの周期及び2nm～100nm、好ましくは10nm～30nmの格子変調深度を有する、請求項20～28

のいずれか1項記載のセンサープラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項30】 第1の光学的に透明な層(a)の変調深度対厚さの比が、0.2以下である、請求項29記載のセンサープラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項31】 1つ以上のルミネセンスの測定のための光学システムによる生物分析的検出法であって、

少なくとも1つの励起光源、

請求項19～30のいずれか1項記載のセンサープラットホーム、

センサープラットホーム上の少なくとも1つ以上の測定領域(d)からの光の測定のための、少なくとも1つの検出器を含むことを特徴とする方法。

【請求項32】 少なくとも1つの光源からの励起光が、コヒーレントであり、かつ光学的に透明な層(a)へのカップリングのための共鳴角で1つ以上の測定領域に向けて発射される、請求項20～31のいずれか1項記載のセンサープラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項33】 シグナル検出のために、少なくとも1つの横方向に分割する検出器が使用される、請求項17～32のいずれか1項記載のセンサープラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項34】 透過光束の整形のためのレンズ又はレンズシステム、光束の偏向及び場合により追加の整形のための平面又は曲面鏡、光束の偏向及び場合によりスペクトル分離のためのプリズム、光束の一部のスペクトル選択的偏向のための二色性鏡、透過光強度の調節のための中性密度フィルター、光束の一部のスペクトル選択的透過のための光学フィルター又はモノクロメーターあるいは励起又はルミネセンス光の離散偏光方向の選択のための偏光選択要素を含む群の光学部品が、1つ以上の励起光源とセンサープラットホームとの間、及び／又は該センサープラットホームと1つ以上の検出器との間に位置している、請求項17～33のいずれか1項記載のセンサープラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項35】 励起光の発射及び1つ以上の測定領域からの発光の検出が、单一又は複数の測定領域について逐次実施される、請求項17～34のいずれ

か1項記載のセンサープラットホームによる生物分析的検出法。

【請求項36】 鏡、偏向プリズム及び二色性鏡を含む群の可動式光学部品を使用することにより、逐次の励起及び検出が実施される、請求項35記載の生物分析的検出法。

【請求項37】 センサープラットホームを、励起及び検出の逐次工程の間に移動させる、請求項35～36のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項38】 アナライト検出のための1つ以上のルミネセンス若しくは蛍光標識が、アナライトに、もしくは競合測定法においてはアナライト類似体に、又は多段階測定法においてはアナライトの結合パートナー若しくは適用される生物学的若しくは生化学的若しくは合成の認識要素の1つに結合している、請求項17～37のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項39】 (1) 等方性に放射されるルミネセンス又は(2)光学的に透明な層(a)にインカップルしており、格子構造(c)によりアウトカップルしているルミネセンス、あるいは(1)と(2)両方の部分のルミネセンスが、同時に測定される、請求項17～38のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項40】 抗体又は抗原、受容体又はリガンド、キレート化剤又は「ヒスチジンタグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA又はRNA鎖、DNA又はRNA類似体、酵素、酵素コファクター又はインヒビター、レクチン及び炭水化物を含む群の1つ以上のアナライトの、同時又は逐次の、定量又は定性測定のための、請求項14～39のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【請求項41】 検査すべき試料が、血液、血清、血漿、リンパ若しくは尿又は卵黄のような天然の体液、又は光学的に混濁した液体又は表面水又は土壤若しくは植物抽出物又はバイオー若しくは合成プロセスのプロセスであるか、又は生存若しくは死亡生物の組織からとったものである、請求項14～40のいずれか1項記載の生物分析的検出法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明の主題は、リガンドの認識及び結合のための生物学的又は生化学的認識要素を含む、官能基化されポリマー補強（立体的に安定化）された小胞、その製造方法並びにその応用である。

【0002】

溶液中及び固体表面の両方の生物分析的応用のための試薬の開発に対するニーズが存在しているが、この試薬は、これに特異的に結合するリガンドの測定のための認識要素として使用するとき、膜受容体のような生物学的分子の機能性及び本来のコンフォメーションを保存するものであり、そしてこの試薬は、同時にこの認識要素との非特異的相互作用を最小にするものである。

【0003】

本発明の主題は、

- A) 小胞、
 - B) 小胞の内及び／又は外表面に結合している、1つ以上のポリマー分子、並びに
 - C) リガンドの認識及び結合のための、少なくとも1つの生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素（該認識要素は、小胞又はポリマー分子に結合又は吸着されている）
- を含むことを特徴とする、生物学的又は生化学的試薬である。

【0004】

本発明の更に別の主題は、生物分析的検出法におけるシグナル生成成分として、更に標識を含むことを特徴とする、官能基化されポリマー補強（立体的に安定化）された小胞である（ここで標識は、ESR若しくはNMR標識、質量標識、電気化学的標識、ルミネセンス標識又は蛍光標識を含む群から選択することができる）。シグナル生成成分としての少なくとも1つの標識は、小胞の内部に位置しているか、あるいは直接に、又はスペーサーによるか若しくはポリマーにより小胞の表面に結合していてもよい。また小胞に、多数の同様な標識、特に同様なルミネセンス又は蛍光標識が会合していてもよい。これは、異なる発光波長及び

同様又は異なる励起波長の複数のルミネセンス又は蛍光標識が使用されるとき、エネルギー伝達が、特異的結合シグナルとバックグラウンドの間の差の改善に利用される、特定の応用には有利であろう。ルミネセンス又は蛍光標識は、従来のルミネセンス又は蛍光標識、即ち、いわゆる半導体に基づくルミネセンス又は蛍光ナノ粒子であってよい (W.C.W. ChanとS. Nie, "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection", Science 281 (1998) 2016-2018)。

【0005】

本発明の更に別の主題は、該官能基化小胞の製造方法及び生物分析的検出法におけるこれらの応用である。これらの方法は、光学シグナル変化、電気化学的検出、インピーダンス分光分析、電子スピニ共鳴、核スピニ共鳴、水晶バランス測定、又はこれらの方法の組合せを含む群から選択することができる。

【0006】

本発明の更に別の主題は、本発明の生物学的又は生化学的試薬の製造方法であつて、

- A) 透析による小胞製造に必要な脂質分子、
- B) 小胞の内及び／又は外表面に結合させるべき、1つ以上のポリマー分子、並びに
- C) リガンドの認識及び結合のための、少なくとも1つの生物学的又は生化学的認識要素（この認識要素は小胞又はポリマー分子に結合又は吸着させるべきものである）

を逐次の混合及び蒸発工程において一緒にする方法である。

【0007】

本発明の更に別の主題は、本発明の生物学的又は生化学的試薬を用いる、生物分析的検出法である。詳細には、アナライトは、光学シグナル変化により検出することができる。光学シグナル変化は、センサープラットホームとして作用する光学センサーによって検出されることが好ましい。好ましくは、光学センサーパラットホームは、光導波管センサー及び表面プラズモン共鳴センサーを含む群から選択される。

【0008】

好ましい実施態様において、検出すべき光学シグナル変化は、センサー表面の近距離場における有効屈折率の変化に基づく。別の好ましい実施態様において、検出すべき光学シグナル変化は、センサーの近距離場において生成するルミネンス又は蛍光に基づく。

【0009】

特に平面又は纖維型導波管を、センサープラットホームとして使用することができる。好ましい実施態様において、第1の光学的に透明な層（a）を第2の光学的に透明な層（b）上に含むことを特徴とする、平面薄膜導波管が使用される。

【0010】

本発明の追加の主題は、励起光が、センサープラットホームとして作用する薄膜導波管に、1個又は数個の格子（c）によりカップリングしている、本発明の生物学的又は生化学的試薬を用いる生物分析的検出法である。

【0011】

層（a）よりも屈折率が低く、そして $5\text{nm} \sim 1000\mu\text{m}$ 、好ましくは $10\text{nm} \sim 1000\text{nm}$ の厚さの、更に別の光学的に透明な層（b'）が、層（a）及び（b）の間で層（a）に接触して位置しているならば、有利であろう。この中間層の目的は、層（a）の下の表面あらさを減少させるか、又は1つ以上の下に位置する層への層（a）中の誘導光の消失性場（エバネッセント場）の透過を減少させるか、又は1つ以上の下の層への層（a）の接着性を改善するか、又はセンサーパラットホームにおける熱誘導ストレスを減少させるか、又は下に位置する層に対して層（a）のミクロ細孔を封止することにより光学的に透明な層（a）を下の層から化学的に単離することである。

【0012】

光学的に透明な層（a）上への生物学的又は生化学的認識要素の堆積のための多くの方法が存在する。これは、例えば、物理吸着又は静電相互作用により達成することができる。そして一般に、認識要素の向きは、ランダムに統計的性質である。更に、アナライト含有試料又はアッセイに適用される試薬の組成を変化さ

することにより、固定化認識要素の一部が洗い流されるリスクが存在する。したがって、光学的に透明な層（a）上への接着促進層（定着層ともいう）（f）の適用は、生物学的又は生化学的認識要素の固定化に有利でありうる。この定着層は、更に光学的に透明であるべきである。詳細には、定着層は、近接した媒体への導波層（a）の消失性場の透過深度を超えてはならない。したがって、定着層は、200nm未満、好ましくは20nm未満の厚さを有すべきである。

【0013】

本発明の更に別の主題は、センサープラットホームとして作用する薄膜導波管が、1つ以上の試料における1つ以上のアナライトの同時又は逐次測定のための、数個の測定領域を含むことを特徴とする、センサープラットホームによる生分析的検出法である。

【0014】

横方向に分離した測定領域（d）は、生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素の該センサープラットホーム上への横方向に選択的な堆積により生成させることができる。ルミネセンスのアナライト、又は固定化認識要素への結合に関してアナライトと競合する、ルミネセンスで標識したアナライトの類似体と接触させるととき、これらのルミネセンス分子は、測定領域（固定化認識要素により占められる領域により限定される）でセンサープラットホームの表面にのみ選択的に結合する。

【0015】

格子構造（c）が、一定周期の回折格子であるならば、多くの応用に有利である。そして、格子構造（c）による測定領域への励起光のインカップリングのため、共鳴角は、格子構造の全範囲において一定である。しかし例えば、顕著に異なる波長の、異なる光源からの励起光をカップリングさせるならば、インカップリングのための関連する共鳴角は、更に顕著に異なることもあり、このため、光学システムハウジングであるセンサープラットホームにおける調整用の追加要素の使用を必要とするか、又は幾何学的に非常に不利なカップリング角になってしまう。よって、例えば、非常に異なるカップリング角を回避するために、格子構造（c）が多重回折格子であれば有利であろう。

【0016】

第2の光学的に透明な層（b）の材料は、ガラス、水晶、又はポリカーボネート、ポリイミド若しくはポリメタクリル酸メチルを含む群の透明熱可塑性プラスチックを含むことを特徴としてよい。

【0017】

光学的に透明な層（a）の表面上のできるだけ強力な消失性場（エバナッセント場）の生成のために、導波管としての光学的に透明な層（a）の屈折率は、近接した層の屈折率よりも顕著に高い必要がある。第1の光学的に透明な層（a）の屈折率が2を超えるならば、特に有利である。

【0018】

第1の光学的に透明な層（a）は、例えば、 TiO_2 、 ZnO 、 Nb_2O_5 、 Ta_2O_5 、 HfO_2 、又は ZrO_2 を含んでよい。第1の光学的に透明な層が、 TiO_2 又は Ta_2O_5 を含むならば、特に好ましい。

【0019】

導波管としての光学的に透明な層（a）の屈折率の他に、その厚さは、低い屈折率を持つ近接した層に対するこの層の界面における、できるだけ強力な消失性場の生成のための、第2の必須パラメーターである。ここで消失性場の強度は、層の厚さが、励起波長で少なくとも1つのモードを導くのに十分である限り、導波層（a）の厚さが低下するにつれ上昇する。ここで、あるモードを導くための最小「カットオフ」波長は、このモードの波長に依存しており、長波長光では短波長光よりも大きい。しかし、「カットオフ」波長のアプローチによっても不必要的伝搬損失が激しく上昇するため、好ましい層の厚さの選択には下限が設定される。好ましいのは、光学的に透明な層（a）の層の厚さが、所定の励起波長で1～3モードの導波だけを可能にするものであり；特に好ましいのは、この励起波長で单一モードの導波管が得られる層の厚さである。ここで誘導光の離散したモードの性状は、横断モードにのみ当てはまることを理解しなければならない。

【0020】

こういった要求の結果として、第1の光学的に透明な層（a）の厚さは、有利には40nm～300nmである。第1の光学的に透明な層（a）の厚さが70nm～

160nmであれば、特に有利である。

【0021】

導波管としての光学的透明な層（a）及び近接した層の所定の屈折率に対して、励起光のインカップリングのための共鳴角は、インカップリングされる回折オーダー、励起波長、及び格子周期に依存する。インカップリング効率を上昇させるには、第1の回折オーダーのインカップリングが有利である。インカップリング効率は、回折オーダーの数は別とすれば、主として格子深度により測定される。原則として、カップリング効率は、格子深度が上昇するにつれ上昇する。しかし、アウトカップリングプロセスは、インカップリングプロセスとちょうど相反するため、アウトカップリング効率は、同時に上昇し、結果、格子構造（c）上に位置するか、又はそれに近接する測定領域（d）におけるルミネセンスの励起に最適になるが、この最適は、測定領域の形及び発射される励起光束の形に依存する。このような境界条件のため、格子（c）が200nm～1000nmの周期及び2nm～100nm、好ましくは10nm～30nmの格子変調深度を有するならば、有利である。

【0022】

変調深度対第1の光学的に透明な層（a）の厚さの比は、0.2以下であることが更に好ましい。

【0023】

ルミネセンスの增幅又はシグナル対バックグラウンド比の改善のため、場合により層（a）よりも低い屈折率の追加の誘電性層（例えばシリカ又はフッ化マグネシウムの）上に、好ましくは金又は銀の薄い金属層を、光学的に透明な層（a）と固定化された生物学的又は生化学的認識要素の間に堆積させるならば、これも有利であろう（ここで金属層及び場合により追加の中間層の厚さは、励起波長及び／又はルミネセンス波長で表面プラズモンを励起させることができるように選択する）。

【0024】

本発明の更に別の主題は、1つ以上のルミネセンスの測定のための光学システムであって、

- 少なくとも 1 つの励起光源、
- 上述の実施態様のいずれか 1 つによるセンサープラットホーム、
- センサープラットホーム上の少なくとも 1 つ以上の測定領域 (d) からの光の測定のための、少なくとも 1 つの検出器を含むことを特徴とするシステムである。

【0025】

ここで、少なくとも 1 つの光源からの励起光が、コヒーレントであり、かつ光学的に透明な層 (a) へのカップリングのための共鳴角で 1 つ以上の測定領域に向けて発射されるならば有利である。

【0026】

单一光源の不十分な強度の場合、又は例えば生物学的応用のための、異なる発光波長を持つ光源が必要な場合、類似又は異なる発光波長を持つ 2 つ以上のコヒーレント光源を使用するならば有利である。

【0027】

多数の測定領域からのシグナルを別々に記録するために、シグナル検出のために少なくとも 1 つの横方向に分割する検出器が使用されることが好ましい。

【0028】

上述のいずれか 1 つの実施態様による、本発明の光学システムにおいて、透過光束の整形のためのレンズ又はレンズシステム、光束の偏向及び場合により追加の整形のための平面又は曲面鏡、光束の偏向及び場合によりスペクトル分離のためのプリズム、光束の一部のスペクトル選択的偏向のための二色性鏡、透過光強度の調節のための中性密度フィルター、光束の一部のスペクトル選択的透過のための光学フィルター又はモノクロメーターあるいは励起又はルミネセンス光の離散偏光方向の選択のための偏光選択要素を含む群の光学部品が、1 つ以上の励起光源とセンサープラットホームの間、及び／又は該センサープラットホームと 1 つ以上の検出器の間に位置してよい。

【0029】

多くの応用に対して、励起光が 1 f秒と 10 分の間の時間のパルスで発射されるならば有利である。

【0030】

反応速度測定のため、又は試料若しくは光学システムの部品の材料中若しくはセンサープラットホーム自体中の蛍光混入物からの急速減衰蛍光の識別のために、測定領域からの発光が時間分割して記録されるならば有利であろう。

【0031】

励起光の発射及び1つ以上の測定領域からの発光の検出もまた、单一又は複数の測定領域について逐次行うことができる。ここで、逐次の励起及び検出は、鏡、偏向プリズム及び二色性鏡を含む群の可動式光学部品を使用することにより実施することができる。別の可能な実施態様において、センサープラットホームは、励起及び検出の逐次工程の間に移動させる。この場合に、1つ以上の励起光源及びシグナル検出に使用される部品は、距離において固定されていてよい。

【0032】

本発明の更に別の主題は、センサープラットホーム上の1つ以上の測定領域での少なくとも1つの試料中のルミネセンス検出による1つ以上のアナライトの測定のための完全な分析システムであって、

- 上述の実施態様のいずれかに記載の光学センサープラットホーム、
- 上述の実施態様のいずれかに記載の光学システム、及び
- 1つ以上の試料をセンサープラットホーム上の測定領域と接触させるための供給手段

と共に、光学フィルム導波管（層状導波管）を含むことを特徴とするシステムである。

【0033】

ここで、試料及びオプションの追加試薬の供給は、圧力差又は電位若しくは電磁ポテンシャルの印加により、平行又は交差マイクロチャネルにおいて実施することができる。

【0034】

アナライトの定量及び／又は定性測定のために、本発明の生物分析的検出法ではまた、アナライト検出のための1つ以上のルミネセンス若しくは蛍光標識が、アナライトに、又は競合測定法においてはアナライト類似体に、又は多段階測定

法においてはアナライトの結合パートナー若しくは適用される生物学的若しくは生化学的若しくは合成の認識要素の1つに結合していることも可能である。

【0035】

上述の方法において、(1) 等方性に放射されるルミネセンス又は(2) 光学的に透明な層(a)にインカップルしており、格子構造(c)によりアウトカップルしているルミネセンス、あるいは(1)と(2)両方の部分のルミネセンスは、同時に測定することができる。

【0036】

本発明の生物分析的検出法は、抗体又は抗原、受容体又はリガンド、キレート化剤又は「ヒストジンータグ成分」、オリゴヌクレオチド、DNA又はRNA鎖、DNA又はRNA類似体、酵素、酵素コファクター又はインヒビター、レクチン及び炭水化物を含む群の1つ以上のアナライトの、同時又は逐次の、定量又は定性測定のために使用される。

【0037】

検査すべき試料は、血液、血清、血漿、リンパ若しくは尿又は卵黄のような自然の体液であってよい。しかし、検査すべき試料はまた、光学的に混濁した液体、表面水、土壤若しくは植物抽出物、バイオー若しくは合成プロセスのプロセスであってもよい。検査すべき試料はまた、生存又は死亡生物の組織からとってもよい。

【0038】

主に2つの側面により、二重層膜を持つ脂質小胞が現在まで使用されている。

第1に、脂質小胞は、生物学的膜のモデルシステムとして研究において応用されている。ここで、小胞は、水に不溶性の膜タンパク質及び受容体の担体システムとして作用する。

第2に、製剤応用において、脂質小胞は、疾患の特異的治療のための治療活性試薬の担体システムとして工業的に応用されている。

【0039】

以下において、文献における両方の表記(「小胞」と「リポソーム」)の様々な使用に関係なく、専ら「小胞」という表記が使用される。

【0040】

一般に、小胞形成性脂質は、疎水性及び極性基をもつ両親媒性脂質を含むことを特徴とする。以下において、疎水性部分は「脂質鎖」と表示され、親水性又は極性部分は「極性ヘッド基」と表示される。水性環境において、このような脂質分子は、脂質小胞のような、二重層構造を自発的に形成することができる。

【0041】

このような小胞の構造及び性状は、標準的教科書、例えば、R.B. Gennis: “Biomembranes”, Advanced Texts in Chemistry” (editor: C.R. Cantor), Springer, Heidelberg, 1989に記述されている。

【0042】

上述の脂質分子はまた、既に展開した二重層又は小胞中に、脂質鎖が脂質二重層の疎水性内部に、そして極性ヘッド基が存在する小胞のヘッド基により形成される領域中に組み込まれるように、容易に組み込むことができる。小胞形成性脂質は、好ましくは、例えばアルキル鎖を含む、種々の不飽和性の14～22個の炭素原子の典型的な長さを持つ、2つの炭化水素鎖を含むことを特徴とする。

【0043】

このような脂質分子は、例えば、種々の生物の生物学的膜から単離することができ、そして「天然脂質」と呼ばれる。典型例は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリンのようなグリセロリン脂質である。他の天然脂質は、糖脂質、ステロール（例えば、コレステロール）、カルジョリピン、プラスマロゲン、及び始原細菌に存在する脂質（例えば、エーテル基に結合した炭化水素鎖を持つもの、分岐炭化水素鎖を持つもの又は脂環構造と共に炭化水素鎖を持つもの）又は脂質分子が脂質二重層にわたって延びている、いわゆる二極性脂質（詳細な説明は、例えば、R.B. Gennis: “Biomembranes”, Advanced Texts in Chemistry” (editor: C.R. Cantor), Springer, Heidelberg, 1989を参照のこと）の分類を含む。更に別の例は、例えば、アバンティ・ポーラー・リピッズ (Avanti Polar Lipids) (アラバスター (Alabaster)、米国) から市販されているような合成脂質を含む。

【0044】

天然脂質の多くはまた、化学合成することができる。更に、天然脂質の分類には属さない、合成により製造される脂質がある。脂質鎖及び極性ヘッド基の両方に、これらは、活性化又は重合しうる基を含んでよい。更に別の例は、臭化ドデシルアンモニウム (DODAB) のような正に荷電した脂質、又はボロ両親媒性物質 (boloamphiphiles) 、及びフッ素化若しくはハロゲン化脂質炭化水素鎖を含む脂質である。

【0045】

広域スペクトルの合成脂質の概観は、J.-H. FurhopとJ. Koenig: "Membranes and Molecular Assemblies: The Synkinetic Approach", Monographs in Supramolecular Chemistry (editor: J.F. Stoddard), The Royal Society of Chemistry, 1994に与えられる。合成脂質は、純粋な化合物として、種々の合成脂質の混合物として、又は合成及び天然脂質を含む混合物として、小胞の形成に理想的に適している。

【0046】

小胞は、典型的には以下のプロトコール（例えば、F. SzokaとD. Papahadjopoulos, Rev. Biophys. Bioeng. 9(1980), 467-508に記載されているような）の1つ又は組合せにより形成される。

【0047】

マルチラメラ小胞 (MLV) は、典型的には、溶媒の留去により有機溶媒中の脂質溶液から適切な容器に前もって堆積させた、脂質フィルムへの水又は水性緩衝液の添加のような、乾燥脂質フィルム又は粉末の種々の条件下での再水和により形成される。攪拌、振盪、音波処理のような製造方法に依存して、そして脂質の性質、イオン強度及び濃度に依存して、わずかな数のパラメーターに言及するために、種々のサイズのMLVが形成される。

【0048】

更に別の製造方法の例は、「溶媒小球法 (solvent spherule method)」、逆相法又は凍結／解凍若しくは脱水／再水和による小胞融合である（例えば、D.D. Lasic, Biochem. J. 256(1988), 1-11を参照のこと）。

【0049】

小ユニラメラ小胞(SUV)は、MLVの音波処理又はフィルターによるMLVの押出によって形成される。後者の場合に、小胞の直径は、典型的には適用したフィルターの孔径と同じオーダーの大きさである。別の非常に有用な製造方法は、界面活性剤希釈法である。ここで、脂質又はMLVを界面活性剤の存在下で溶解し、そして界面活性剤を、下記で、希釈、透析、クロマトグラフィー、吸着、限外濾過又は遠心分離により除去して、最後にSUVが形成される。

【0050】

大ユニラメラ小胞(LUV)は、典型的には界面活性剤の除去により、又は注入法(ここで、有機溶媒に溶解した脂質を水又は水性緩衝液に注入する)により、又は逆相蒸発法により形成される。後の場合にLUVは、有機溶媒(ここに脂質を溶解して、これを水相に分散させる)の小滴の放出により形成される。

【0051】

非常に大きな小胞は、例えば、水溶液中の均質に乾燥させた脂質フィルムの無振動膨潤により形成することができる。

【0052】

本発明の生物学的又は生化学的試薬のために、直径20~1000nm、特に直径50~400nmの小胞が好ましい。最も好ましいのは、直径50~200nmの小胞である。

【0053】

B)の下に言及されるポリマーは、小胞の安定化と、表面への非特異的結合の減少との両方のために使用される。特に、本発明の生物学的又は生化学的試薬は、親水性ポリマー分子(これが、小胞の内及び/又は外表面に結合している)を含むことに言及すべきである。この親水性ポリマーは、親水性シェルの生成のために小胞に結合している。このシェルは、分子の小胞内又は小胞外への拡散に対する立体障壁とみなすことができる。したがって、このような小胞はまた、「立体的に安定化された小胞」とも呼ばれる。理想的な場合に、小胞結合ポリマーは、そのコンフォメーションの高い融通性を有するため、高いエントロピーに対応して、異なるコンフォメーション間の高速の変化が可能になる。粒子又は肉眼的

表面（例えば、センサーの表面）への、このような小胞の接近又は更には結合に際して、ポリマーのコンフォメーションの自由度の減少は、エントロピーの消失に対応する。これにより、他の粒子又は肉眼的表面への（非特異的）結合が減少する。この効果は、「エントロピーの遮蔽」と呼ばれる（D.D. LasicとF. Martin: “Stealth Liposomes”, CRC Press, Boca Raton, 1995）。このような小胞は、単核食細胞系から免れることができ、「ステルス小胞（Stealth Vesicles）」とも呼ばれる。これらは、生物における薬剤の輸送のために適用される。本発明に関して、このような小胞は「立体的に安定化された小胞」（SSV）と呼ばれる。

【0054】

ポリマー分子は、下記方法の1つ又は組合せにより、小胞に結合させることができる：

(1) ポリマーの正に（又は負に）荷電した部分と小胞表面の負に（又は正に）荷電した基の間の静電相互作用。小胞の電荷は、例えば、極性脂質ヘッド基、又は天然若しくは人工ポリペプチドのような小胞二重層の中若しくは上の他の適切な化合物から生じてよい。

【0055】

(2) 脂質分子の極性ヘッド基へのポリマー分子の共有結合（小胞の脂質二重層への組み込みのためのアンカーとして役立つ）。脂質の適切な官能基は、ジアシルグリセロホスファチジルエタノールアミンのようなアミノ基、又は天然若しくは合成脂質分子のSH基若しくはOH基である。ポリマーは、脂質分子に直接、及び脂質分子又は脂質型分子間のスペーサー分子を用いての両方で結合させることができる。活性なヘッド基を持つこのような化合物の幾つかは、市販されており、そしてこれらは、例えば、アミン又はチオールと反応性である。例としては、スクシンイミド誘導体、ピリジニルチオ誘導体又はマレイイミド誘導体を含み、そして一部は、例えば、アバンティ・ポーラー・リップツ（Avanti Polar Lipids）（アラバスター（Alabaster）、米国）から市販されている。更に、市販されていない例は、G. Brinkら, Biochem. Biophys. Acta 1196 (2, 1994) 227-230に記載されている。

【0056】

(3) 他の適切なアンカー分子は、天然の膜貫通型タンパク質若しくは膜スパンディングポリペプチド、又は膜結合型タンパク質若しくはポリペプチド、又はこれらの合成類似体である。該膜タンパク質又はポリペプチドはまた、例えば、膜スパンディング又は膜貫通型タンパク質又はポリペプチドの場合には、膜の疎水性コアとも呼ばれる。外在性タンパク質又はポリペプチド分子は、主としてイオン相互作用、水素結合、又は疎水性相互作用により、更にはある場合にはタンパク質分子に共有結合している脂質アンカーにより、膜と会合している (L. Stryer: "Biochemistry", 4th edition, Freeman (1995) 275pp.を参照のこと)。

【0057】

種々の親水性ポリマーが小胞への結合に適しており、その幾つかの例が下記に記載されている。

(1) 非荷電ポリマー

「ステルス小胞」と一緒にポリエチレングリコール及びその誘導体の使用は、D.D. LasicとF. Martin: "Stealth Liposomes", CRC Press, Boca Raton, 1995に記載されている。米国特許第5,534,241号、5,770,222号、及び5,891,468号では、小胞結合ポリエチレングリコール又は類似の親水性ポリマーが、親水性及び疎水性ポリマーよりなり、小胞中に封入された疎水性ポリマーと薬物を閉じこめて遮蔽し、そして適切な生理条件下でこの親水性ポリマーの開放によりこれらの封入疎水性ポリマーと薬物を放出する目的のための、ジブロックコポリマーの一部として記載されている。

【0058】

(2) 荷電ポリマー

負に若しくは正に荷電したポリマー、又は両性イオン性ポリマーも含めて使用することができる。典型例は、ポリペプチド及びポリスルホキシドであり、そしてこれらは、例えば、米国特許第5,891,468号に言及されている。

【0059】

(3) 炭水化物及びその誘導体

例としては、キチン／キチンーデキストラン、デンプン及び米国特許第5,891,

468号に言及される類似のポリマーがある。

【0060】

(4) 樹状親水性ポリマー

この分類の典型例は、G.R. Newkome, C.N. Moorefield, 及びF. Voegtle: “Dendritic Molecules”, Verlag Chemie (1996)に記載されている。

【0061】

脂質小胞の応用には2つの異なる主な領域がある。第1の応用領域は、主として基礎研究における生物学的膜のためのモデル系としての脂質小胞の用途である(例えば、R.B. Gennis: “Biomembranes”, Advanced Texts in Chemistry (editor: C.R. Cantor), Springer, Heidelberg (1989)を参照のこと)。この参考文献に記述されている応用において、小胞は主に、イオンチャネル受容体(例えば、nAchR=アセチルコリン受容体、5HT3受容体、グルタミン酸受容体、GABA受容体)、Gタンパク質結合受容体(例えば、ニューロキニン受容体、ケモカイン受容体、 β アドレナリン作動性受容体)、膜酵素(例えば、チロシンキナーゼ、アデニルシクラーゼ)、及び膜輸送体(例えば、ATPアーゼ)のような、水不溶性膜タンパク質及び受容体の担体として使用される。

【0062】

もう1つの主な応用領域は、疾患の特定の治療用薬物の担体としての、又は投与のための小胞の用途に関する。この応用のための小胞の用途は、20年以上知られている。初期の応用の多くは、典型的には幾つかの中性又は負に荷電した、異なる脂質(主にリン脂質)及び/又はコレステロールよりなる、いわゆる従来の小胞に基づいている。薬物投与のための使用中、これらの従来の小胞は、血液中の循環時間が非常に短い。インビボ投与中、これらは、単核食細胞系の食細胞中に急速に蓄積される強い傾向を示す。不利な短い循環時間を克服するため、既に上述のように、親水性ポリマーを小胞に結合させている。

【0063】

小胞を更に特異的に適用したい組織に向けるために、特異的認識要素として、小胞に抗体又は抗体断片(F_{AB})を結合させる。インビボ投与後、これらの小胞は、血流中を循環し、会合している抗体により、標的組織に特異的に存在する標

的抗原に結合することによって、その組織に小胞及び小胞により輸送される薬物が濃縮する。したがって、これらの小胞は、免疫リポソームと呼ばれる。ここで、抗体は、小胞の脂質に直接又はいわゆるスペーサー分子により結合することができる。また、SSV（立体的に安定化された小胞）の形成のために適用される、ポリエチレングリコール（PEG）のようなポリマーもスペーサーとして使用することができ、このため、ポリマー鎖の末端で抗体の結合が生じる。他の既知の例は、抗体が親水性ポリマーシェルの中に位置するような、SSVの脂質への抗体の直接結合（又は短いスペーサー分子によるその結合）を含む。

【0064】

例えば、PEG（分子量10,000～100,000Da）及びこれらに共有結合している認識要素（いわゆるエフェクター）の外部親水性層を有する、患者の治療のためのリポソーム組成物が、W0 94/21235において特許請求されている。この特許出願では、血流中の小胞の分解を防ぐためのPEGのシェルが特許請求されている。エフェクターは、小及び中サイズの免疫学的認識要素、即ちF_{ab}断片、糖タンパク質、サイトカイン、多糖類、又は種々のペプチド及びペプチドホルモンからなる。W0 97/35561では、水溶性ポリマーシェルにより安定化された生物学的に活性なリポソームが、治療用途のために特許請求されている。ここで、活性型の生物学的な両親媒性の認識要素は、非共有的に、即ち、物理吸着により、ポリマー補強されたリポソームと会合している。特定の場合に、認識要素は、ペプチドの「成長ホルモン放出因子」である。押出により製造された直径300nm未満のユニラメラリポソームが好ましい。ポリマーとして、好ましくは、リポソーム形成性膜中の共有結合したPEG脂質として提供されるPEGが使用される。より広い意味で、更に検出の目的で標識を含む脂質組成物が、診断目的のために特許請求されている。蛍光マーカー、放射活性標識、染料、及び核スピン共鳴におけるシグナル増幅のための成分が、検出可能なマーカーとして列挙されている。小胞への標識の結合の方法及び位置は、特定されていない。

【0065】

別の変法（米国特許第5,891,468号）では、ポリマー鎖の末端に結合した細胞受容体の認識のためのリガンドを含む、ポリマー補強された小胞が、治療応用の

ために特許請求されている。この小胞は、標的認識の成功後、リガンドー受容体相互作用、及び標的膜との小胞の引き続く融合によって、親水性ポリマー鎖を放出するという追加の機能を有するものである。他のものに加えて、W0 97/33618では、特に癌治療における治療目的の細胞内薬物投与のための、Tリンパ球により送達される小胞が特許請求されている（ここで、認識要素は、スペーサーポリマースペーサー型の組合せにより結合されている）。具体的には、H P M Aコポリマーがポリマーとして使用される。ペプチド、細胞毒、核酸、抗原、及び薬物が、認識要素として記載されている。後の特許では、ポリマーとしてP E Gを使用する（W0 98/51336）ことで延長部が導入され、そして、以下では、適用の範囲が拡大された（例えば、インターロイキン2ペプチド（I L 2）をI L 2 T細胞膜受容体認識のためのリガンドとする（W0 99/07324））。

【0066】

上述の小胞及びこれらの応用の領域は、これまで専ら、担体又は輸送ビヒクルとしての小胞の主な機能による、治療用途に関するものである。生物分析分野には小胞の用途に関する孤立した報告があるだけである。W0 97/39736では、例えば、患者からの試料の分析のための免疫測定法のための試薬として、小胞が記述されている。この特許出願では、一般にアナライト分子の検出のために、リガンドが会合した小胞が特許請求されている（ここで、リガンドは、タンパク質、ペプチド、抗体又はその断片、及び核酸よりなってよい）。特異的なリガンドは、免疫学的認識のための小さなハプテン分子であり、そしてこれらは、特にハプテン脂質の形で、小胞に共有結合している。測定法におけるシグナル検出は、それぞれの生物学的受容体と共に提供される、ビーズ、粒子又はマイクロタイヤープレートの壁の形の固相表面への小胞試薬の結合により行われる。測定法におけるシグナル生成は、アナライトの認識成功後に、例えば、サンドイッチ測定法では、リポソームへの溶液中の2次標識の結合により確立される（ここで、標識は、蛍光若しくはルミネセンス分子、染料、又はアルカリホスファターゼのようなシグナル生成酵素である）。肉眼的固相表面への結合の代わりに、特異的な生物認識が、それぞれの受容体を有する第2の小胞への結合により起こりうる。いずれの場合にも、小胞の存在下での特異的なリガンドー受容体結合は、分析の間中

保存されなければならない。この引用文献では、リポソームの安定化のための追加のポリマーが、使用又は記述されていないことに注意されたい。

【0067】

更に別の応用として、生物分析的検出法におけるシグナル增幅のための小胞の用途が、幾つかのグループにより報告されている。例えば、平面導波管上の蛍光に基づく免疫測定法における小胞の用途が、S.A. Choquette: "Planar waveguide immunosensor with fluorescent liposome amplification", Analytical Chemistry 64(1992) 55-60に報告されている。ここでは、溶液中で小胞結合テオフィリン分子が、アナライトとしての遊離テオフィリン分子と、導波管表面上に固定化されている抗テオフィリン抗体への結合に関して競合する、競合測定法が記述されている。小胞の親水性内面には、蛍光標識として複数のカルボキシフルオレセイン分子が同時に装填されている。したがって、分析すべき試料中にテオフィリンが存在しないとき、最大の非常に強い蛍光シグナルが観測される。しかし、小胞の安定性は、ポリマーにより強化されず、その結果、試料の特定の組成に依存して、封入された蛍光標識の幾分の漏出が予測されるはずである。

【0068】

アナライトの測定のための表面制限法において、親和性システムの1つのパートナーは、後の測定法において試料からのアナライトを特異的に認識及び結合するために、例えば、生化学センサーの化学物質の固相表面上に固定化されている。このため、表面の官能基化は本質的に重要である。特にその環境に対して敏感な生物学的相互作用の場合には、例えば、膜受容体では、認識要素の未変性コンフォメーションの保存は、特異的な結合能力を維持するのに重要である。同時に、表面に対する非特異的結合を最小化することも重要である。固相表面上のアナライトの測定のための種々の方法が知られている。ここで、表面制限されたセンサーの近距離場における相互作用に基づく光学的分析法は、結合事象の障害が最小であるため、特に高い重要性を有する。例えば、導波管の消失性場における、又は金属薄膜において生成する表面プラズモンの場の浸透深度における（表面プラズモン共鳴、SPR）、屈折又はルミネンスンスに基づく分析法は、このような光学的近距離場法として知られている。

【0069】

平面導波管の消失性場における蛍光励起による蛍光に基づく分析法は、例えば、単一アナライトの測定についてはWO 95/33197及びWO 95/33198に、そして複数アナライトの同時測定についてはWO 96/35940に記載されている。

【0070】

本発明の特定の実施態様において、脂質と両親媒性又は親水性ポリマーは、リガンドの認識及び結合のための生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素を含む、立体的に安定化された小胞に変えられる。ここで、「生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素」とは、任意の他の化合物に特異的に結合する、任意の生物学的分子若しくは生物学的分子複合体又は合成功子若しくは合成功子複合体を意味する。好ましくは、抗体、抗体断片、核酸又は核酸類似体、DNA、RNA、酵素、天然及び合成ポリペプチド、ヒスチジンータグー成分、及び膜受容体を含む群の、生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素が使用される。該他の化合物は、該認識要素により特異的に認識及び結合される、イオン、原子、原子のクラスター、分子、分子クラスター、任意の合成若しくは生物学的化合物又はこれらの一剖であってよい。リガンド又はアナライトへの十分な接近容易性を提供するために、生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素は、小胞の表面に会合されるか若しくは組み込まれるか、又はポリマー若しくは小胞の脂質に結合されるのが好ましい。

【0071】

該認識要素による該化合物の特異的な認識及び結合は、生物分析的測定法の一部であり、よって本発明の別の主題としてよい。

【0072】

例えば、該化合物は、試料中の測定すべきアナライトであってよい。ここで、測定は、アナライト自体又はアナライトの類似体（例えば、競合分析法において）の結合により引き起こされる、物理的に測定可能なパラメーターの変化の測定により、あるいは多段階の結合事象（ここで、アナライト又はその類似体は、部分工程の1つにおいて結合される）において行うことができる。物理的に測定可能なパラメーターの変化は、例えば、ルミネセンス励起後のルミネセンスにより

、又はその励起後のESR若しくはNMR一標識からのシグナルにより、又は表面上に吸着された分子質量の変化により起こりうる。測定は、自由溶液中で、又は固相表面上で、例えば、センサーの表面上で行うことができる。

【0073】

上述の再構成された小胞の非特異的結合の最小化のために、脂質混合物の組成、小胞若しくは修飾センサー表面の電荷、界面活性剤の添加、及び緩衝液のイオン強度のような、種々のパラメーターを変化させた。これら全てのパラメーターは、ある程度非特異的結合の減少に寄与できるが、最終結果の残留非特異的結合はなおも高すぎた。

【0074】

対照的に、小胞へのPEG脂質の組み込みによって、非特異的結合の驚くべき激しい減少が起こった。実際は、立体障害のため特異的結合シグナルの減少も存在する。しかし最終結果として、測定技術において本質的なパラメーターである、特異的シグナル対非特異的シグナルの比の顕著な改善が見られる。観測される結合シグナルに及ぼすポリマーの組み込みの効果は、以下のとおり説明することができる：ポリマーは、膜の周囲に立体障壁を形成することにより、非特異的結合の減少が観測される。PEGの種々の鎖長（750、2000及び5000ダルトンの分子量を持つ）のPEG脂質が使用された。

【0075】

本発明は、以下の実施例において更に詳細に説明される。

【0076】

実施例

計測

生物分析的測定法は、市販のSPR構成（バイアコア（Biacore）1000、ウプサラ、スウェーデン）により実施した。異なる記載がなければ、本法は、25°Cで25μl/分の流量での一定流下で実施した。

【0077】

a) センサー表面の官能基化

溶媒の蒸発を回避するために、エタノールを飽和させたチャンバー中でSPR

構成の外側に、SPRセンサーチップJ1（バイアコア（Biacore））の清浄な金表面上での16-メルカプトヘキサデカン酸と11-メルカプトウンデカノールの自己集合により、単分子層（自己集合单層、SAM）を生成させた。したがって、1:7の水／エタノール中の1mM 16-メルカプトヘキサデカン酸及び1.5mM 11-メルカプトウンデカノールを含む溶液（1:1の水／エタノール中の4mM 16-メルカプトヘキサデカン酸及びエタノール中の6mM 11-メルカプトウンデカノールのストック溶液（それぞれ40μl）とエタノール80μlとの混合物からとる）を30μlのアリコートでセンサー表面上に堆積させた。30分後、溶液を交換することにより、80～100分後に混合自己集合单層（SAM）が形成した。

【0078】

SPR構成へのSPRチップの挿入後、SAMを以下の方法により官能基化した：センサー表面を最初にHEPES緩衝化塩溶液（HBS：10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005%トウイーン20、pH 7.4）により10μl/分の流量で洗浄した。

【0079】

次に0.2M N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド（EDC）／0.05M N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）20μLを、チップ表面に5μL/分の低流量で供給し、続いて1:3の水／HBS中のストレプトアビシン溶液（250μg/ml）50μl、そして更にエタノールアミン溶液（1M、pH 8.5）35μlをそれぞれ5μl/分の流量で注入した。最後に、HBS中のビオチン化 α -ブンガロトキシン（biotin-BgTx）の溶液（50μg/ml）の2分間の供給によって、 α -ブンガロトキシン（BgTx）を表面に結合させた。

【0080】

- b) 脂質小胞におけるニコチンーアセチルコリン受容体（nAChR）の再構成
クロロホルムに溶解した脂質を、所望の比（典型的には80mol% 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロー-3-ホスファチジルコリン（DOPC）、10%コレステロール（Chol）、及び10% 1,2-ジオレオイル-sn-グ

リセロー-3-ホスファチジルグリセロール (DOPG)) で混合した。溶媒の留去後、堆積した脂質フィルムを、緩衝液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、pH 7.4) 480 μl 及び CHAPS (10% w/w) 270 μl の添加により再度溶解することにより、引き続く超音波暴露後、2 mg/ml の最終脂質濃度を得た。濃縮受容体膜 (1. 9 mg/ml) 250 μl を加え、生じた懸濁液を、攪拌後、遠心分離することにより、溶けていない物質を除去した。「スライドーアーライザー (slide-a-lyser)」中で 650 倍緩衝液容量 (500 mM NaCl、10 mM HEPES、3 mM EDTA、1 mM NaN₃、pH 7.4) に対する上清の透析 (最初に室温で 30 分間、次に 8~15 時間、そして最後に再度 2~4 時間; 透析緩衝液は各工程について交換した) により、脂質小胞を生成した。透析した小胞は、2 日間まで貯蔵して、SPR 測定を実施する前に再度遠心分離することにより、再構成していない受容体から生成した凝集物を除去した。異なる記載がなければ、全ての工程は 4°C で実施した。

【0081】

小胞に組み込まれる受容体の濃度は、大過剰 CHAPS の存在下で 280 nm の光学密度 ($\varepsilon = 450, 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) の測定により求めることによって、小胞を溶解し、かつ光散乱効果を減少させた。観測される吸収が専ら nAchR により引き起こされたと仮定して、350 nM という典型的な受容体濃度を求めた。直径 18~20 nm の小胞の狭いサイズ分布を、以下の標準法にしたがい準弾性光散乱によって求めた。1 脂質分子当たり 60 Å² の典型的な表面に基づき、1 つの小胞が平均 4000 個の脂質分子及び 0.5 個の受容体を含むことを推定した。

【0082】

nAchR-小胞の非特異的結合

(1) nAchR-小胞の 4 つの溶液 (溶液 (1) ~ (3) は PEG 含まず、(4) は 2% PEG 脂質含む) を上述の方法により調製した。溶液 (1) ~ (3) を 650 倍緩衝液容量 (10 mM HEPES、3 mM EDTA、1 mM NaN₃、pH 7.4) に対して室温で透析した。(1) 及び (2) のための透析緩衝液は、更に 500 mM NaCl を含み、(3) のための透析緩衝液は更に 500

mM NaCl 及び CHAPS を臨界ミセル濃度 (CMC) の $1/10$ に対応する濃度、即ち、約 0.5 mM で含ませた。30分後、緩衝液を交換し、そして緩衝液(1)のイオン強度は、 500 mM NaCl から 300 mM NaCl に低下した。更に 4°C で 5 時間の透析後、緩衝液を再度交換したが、すると緩衝液(1)のイオン強度は、更に 150 mM NaCl まで低下した。 4°C で 10 時間後、透析を終了した。

【0083】

脂質の非特異的結合を減少させるために、センサー表面を、 150 mM NaCl、 10 mM HEPES、 3 mM EDTA、 1 mM NaN₃ からなる緩衝液 (pH 7.4) 中の 70% DOPC (1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン)、10% DOPG (1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルグリセロール)、10% chol、3% 1,2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジン酸 [ポリ(エチレングリコール)] エステル ($M_r \text{ PEG} = 750$ 、DMPA-PEG₇₅₀)、3% 1-パルミトイール-2-オレオイル-sn-グリセロ-ホスファトエタノールアミン-N- [ポリ(エチレングリコール)] ($M_r \text{ PEG} = 2000$ 、POPE-PEG₂₀₀₀) 及び 3% 1-パルミトイール-2-オレオイル-sn-グリセロ-ホスファトエタノールアミン-N- [ポリ(エチレングリコール)] ($M_r \text{ PEG} = 5000$ 、POPE-PEG₅₀₀₀) の 1 モル組成物の混合物で前処理した。

【0084】

(2) 固定化認識要素として BgTx により修飾したセンサー表面への小胞の非特異的結合の測定のため、BgTx に対する小胞上の nAchR の全ての結合部位を大過剰の BgTx で飽和させ、次に BgTx 修飾センサー表面への飽和小胞の結合を、それぞれの透析緩衝液の溶液中で、非特異的結合のシグナルとして測定した。次に特異的結合シグナルは、BgTx で飽和していない小胞で得られる全結合シグナルと非特異的シグナルの間の差として求めた。結果は、表 1 に要約した。

【0085】

【表1】

表1:

	全シグナル (kRU)	非特異的 シグナル (kRU)	特異的 シグナル (kRU)	特異的/ 非特異的 シグナル
標準小胞	0.624	0.395	0.229	0.56
SSV, $MW_{PEG}=750$	0.604	0.234	0.37	1.58
SSV, $MW_{PEG}=2000$	0.474	0.160	0.314	1.96
SSV, $MW_{PEG}=5000$	0.151	0.071	0.080	1.13

【0086】

この実施例では、特異的シグナルと非特異的シグナルの最大比が、750～2000ダルトンのPEG分子量のPEG脂質で観測された。PEG脂質の百分率は、全数の小胞形成性脂質の一部として、0%～10%の範囲で変動した。ここで、PEG脂質の百分率が大きいと、立体障害のため、特に長鎖ポリマーの場合には、特異的結合シグナルの不利な減少が起こるという傾向が観測された。本発明により、ポリマー鎖長の最適な選択及びポリマー結合脂質の最適な百分率は、小胞に会合した生物学的若しくは生化学的又は合成の認識要素のサイズ、及び結合されるアナライトに対する接近容易性に依存しており、

- 大きな認識要素の場合には、比較的長鎖(PEG)のポリマー及び/又は全数の脂質分子の一部としてこれらのポリマー百分率が大きいこと、あるいは
 - 小さな認識要素の場合には、比較的短鎖(PEG)のポリマー及び/又は全数の脂質分子の一部としてこれらのポリマーの百分率が小さいこと
- が好ましい傾向があった。

【手続補正書】

【提出日】平成13年11月28日(2001.11.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の名称】官能基化された小胞

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0064】**

例えば、PEG(分子量10,000~100,000Da)及びこれらに共有結合している認識要素(いわゆるエフェクター)の外部親水性層を有する、患者の治療のためのリポソーム組成物が、W0 94/21235において特許請求されている。この特許出願では、血流中の小胞の分解を防ぐためのPEGのシェルが特許請求されている。エフェクターは、小及び中サイズの免疫学的認識要素、即ちF_{AB}断片、糖タンパク質、サイトカイン、多糖類、又は種々のペプチド及びペプチドホルモンからなる。W0 97/35561では、水溶性ポリマーシェルにより安定化された生物学的に活性なリポソームが、治療用途のために特許請求されている。ここで、活性型の生物学的な両親媒性の成分は、非共有的に、即ち、物理吸着により、ポリマー補強されたりリポソームと会合している。特定の場合に、認識要素は、ペプチドの「成長ホルモン放出因子」である。押出により製造された直径300nm未満のユニラメラリポソームが好ましい。ポリマーとして、好ましくは、リポソーム形成性膜中の共有結合したPEG脂質として提供されるPEGが使用される。より広い意味で、更に検出の目的で標識を含む脂質組成物が、診断目的のために特許請求されている。並光マーカー、放射活性標識、染料、及び核スピン共

鳴におけるシグナル増幅のための成分が、検出可能なマーカーとして列挙されている。小胞への標識の結合の方法及び位置は、特定されていない。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/EP 00/04491

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 683 397 A (NISSUI SEIYAKU CO) 22 November 1995 (1995-11-22) abstract column 6, line 39 - line 42 column 7, line 8 -column 8, line 39; example 1	1-15
X	EP 0 475 786 A (WAKO PURE CHEM IND LTD) 18 March 1992 (1992-03-18) page 3, line 46 - line 58 page 9, line 47 -page 10, line 4; table 2	1-15
X	WO 97 35561 A (RUBINSTEIN ISRAEL ;UNIV ILLINOIS (US); ONYUKSEL HAYAT (US)) 2 October 1997 (1997-10-02) cited in the application page 5; claims 1-5,13-15,19-22	1-13

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

*Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the International filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

6 November 2000

20/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5018 Patentkasse 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, TX: 31 661 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3070

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/04491

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARRISON B A ET AL: "A kinetics approach to the characterization of an IgM specific for the glycolipid asialo-GM1" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, NL, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, vol. 212, no. 1, 1998, pages 29-39, XP004143113 ISSN: 0022-1759 abstract page 31, column 2, paragraph 3 -page 34, column 1, paragraph 2	1,15-41
X	US 5 891 468 A (ZALIPSKY SAMUEL ET AL) 6 April 1999 (1999-04-06) cited in the application column 6, line 24 - line 65; figure 4 column 11, line 25 -column 12, line 35	1-13
A	US 5 494 803 A (CARBONELL RUBEN G ET AL) 27 February 1996 (1996-02-27) column 1 -column 4; figures 1,2	1,15-41
P,A	EFREMOVA NADEZHDA V; BONDURANT BRUCE; O'BRIEN DAVID F; LECKBAND DEBORAH E: "Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains" BIOCHEMISTRY, vol. 39, 28 March 2000 (2000-03-28), pages 3441-3451, XP002152050 page 3447, column 2 -page 3449, column 2	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/04491

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0683397	A	22-11-1995	JP 2711974 B JP 6230010 A US 5756363 A CA 2153874 A WO 9418567 A	10-02-1998 19-08-1994 26-05-1998 18-08-1994 18-08-1994
EP 0475786	A	18-03-1992	AT 140541 T DE 69120883 D DE 69120883 T JP 6186233 A	15-08-1996 22-08-1996 06-03-1997 08-07-1994
WO 9735561	A	02-10-1997	AU 2426197 A AU 2549297 A CA 2250219 A EP 0914094 A WO 9735560 A	17-10-1997 17-10-1997 02-10-1997 12-05-1999 02-10-1997
US 5891468	A	06-04-1999	US 6056973 A AU 715063 B AU 4987897 A BR 9712230 A EP 0932391 A WO 9816202 A	02-05-2000 13-01-2000 11-05-1998 25-01-2000 04-08-1999 23-04-1998
US 5494803	A	27-02-1996	WO 9310226 A	27-05-1993

フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
G O 1 N 33/532		G O 1 N 33/532	A
33/543	5 9 5	33/543	5 9 5
(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J , C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K E, L S, M W, M Z, S D, S L, S Z, T Z, U G , Z W), E A (A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A E, A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C R, C U, C Z, D E, D K, D M, E E, E S , F I, G B, G D, G E, G H, G M, H R, H U, I D, I L, I N, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V , M A, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, T Z, U A , U G, U S, U Z, V N, Y U, Z A, Z W			
(72) 発明者 パウラク, ミハエル ドイツ国、デー-79725 ローフェンブル ク、アンデルスバッハシュトラーセ 5			
F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 EA01 EA02 FA06 HA01 HA02 HA03 HA05 HA07 HA09 JA01 JA02 2G059 AA05 BB12 CC16 EE04 EE05 EE07 EE12 FF12 GG03 JJ01 JJ02 JJ07 JJ11 JJ13 JJ14 JJ17 JJ19 JJ22 KK01			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.